



APPENDIX D

Certified Copy of Federal Rep. Germany Application 197 08 506.1

Filed 26 February 1997.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Epthilon E und F"

am 25. Februar 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 D, C 12 P und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 17. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 197 07 506.1

Wegner

Epothilon E und F

Produktionsstamm:

Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wurde im Juli 1985 an der GBF aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi isoliert und am 28.10.91 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter Nr. DSM 6773 hinterlegt.

Die Charakterisierung des Produzenten sowie die Kulturbedingungen sind beschrieben in: Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel. DE 41 38042 A1, offengelegt am 27. Mai 1993.

Bildung der Epothilone E und F während der Fermentation:

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor wird mit 60 l Medium (0,8 % Stärke; 0,2 % Glucose; 0,2 % Soyamehl; 0,2 % Hefeextrakt; 0,1 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Zusätzlich werden 2 % Adsorberharz (XAD-16, Rohm und Haas) zugegeben. Das Medium wird durch Autoklavieren (2 Std., 120 °C) sterilisiert. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium (zusätzlich 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4) in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 Upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Belüftung von 0,2 Nl pro m^3 und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7-10 Tage. Die gebildeten Epothilone werden während der Fermentation kontinuierlich an das Adsorberharz gebunden. Nach Abtrennen der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingengt und in 700 ml Methanol aufgenommen.

HPLC-Analyse des XAD-Eluates:

Gegenüber dem Ausgangsvolumen des Reaktors (70 l) ist das Eluat 100 : 1 konzentriert. Die Analyse wird durchgeführt mit einer HPLC Anlage 1090 der Fa. Hewlett Packard. Zur Trennung der Inhaltstoffe wird eine Microbore Säule (125/2 Nucleosil 120-5 C_{18}) der Fa. Machery-Nagel (Düren) verwendet. Eluiert wird mit einem Gradienten aus Wasser / Acetonitril von anfänglich 75 : 25 bis zu 50 : 50 nach 5,5 Minuten. Dieses Verhältnis wird bis zur 7. Minute gehalten, um dann bis zur 10. Minute auf 100 % Acetonitril anzusteigen. Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Bandbreite von 4 nm. Die Dioden Array Spektren werden im Wellenlängenbereich von 200 - 400 nm gemessen. Im XAD-Eluat fallen 2 neue Substanzen mit R_f 5,29 und R_f 5,91 auf, deren Absorptionsspektren mit denen von Epothilonen A bzw. B identisch sind (Abb. 1; E entspricht A, F entspricht B). Diese Substanzen werden unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nur in Spuren gebildet.

Biotransformation von Epothilon A und B zu Epothilon E und F:

Für die gezielte Biotransformation wird eine 4 Tage alte, mit Adsorberharz gehaltene 500 ml Kultur von So ce90 verwendet. Von dieser werden 250 ml unter Zurücklassen des XAD in einen sterilen 1 l Erlenmeyerkolben überführt. Danach wird eine methanolische Lsg. einer Mischung von insgesamt 50 mg Epothilon A + B zugegeben und der Kolben für 2 Tage bei 30 °C und 200

Upm auf einer Schütteltruhe inkubiert. Die Bildung der Epothilone E und F wird direkt aus 10 µl des zentrifugierten Kulturüberstand analysiert (Abb. 2). Die Umwandlung erfolgt nur in Gegenwart der Zellen und ist abhängig von der eingesetzten Zelldichte und der Zeit. Eine Kinetik der Umwandlung ist für Epothilon A in Abb. 3 dargestellt.

Isolierung von Epothilon E und F

Zur Isolierung von Epothilon E und F werden 3 Schüttelkolbenansätze aus der Biotransformation (s.o.) vereinigt und 1 h mit 20 ml XAD-16 geschüttelt. Das XAD wird durch Absieben gewonnen und mit 200 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird i.Vak. zu 1.7 g Rohextrakt eingedampft. Dieser wird zwischen 30 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser verteilt. Aus der Ethylacetatphase werden beim Eindampfen i.Vak. 330 mg eines öligen Rückstandes erhalten, die in 5 Läufen über eine 250 x 20 mm RP-18 Säule chromatographiert werden (Laufmittel: Methanol/Wasser 58:42, Detektion 254 nm).

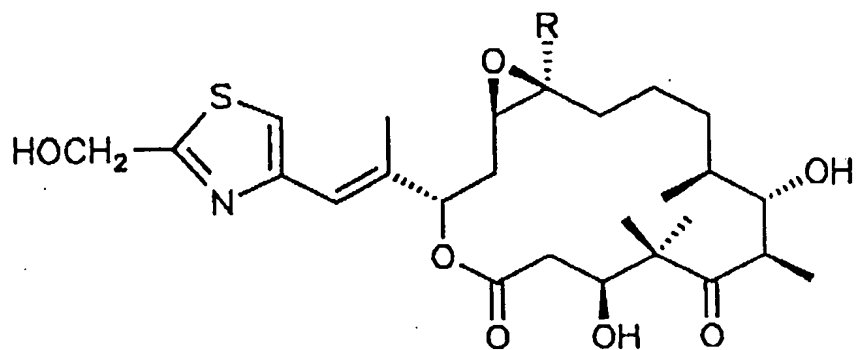
Ausbeute: Epothilon E 50 mg
 F 10 mg

Biologische Wirkung von Epothilon E:

In Zellkulturen wurde die Konzentration bestimmt, welche das Wachstum um 50 % reduziert (IC_{50}) und mit den Werten für Epothilon A verglichen.

Zelllinie

	<u>IC_{50} (ng/ml)</u>	
	<u>Epothilon E</u>	<u>Epothilon A</u>
HeLa, KB-3.1 (human)	5	1
Mausfibroblasten, L929	20	4



Epothilone E R = H

Epothilone F R = CH₃

EPOTHILON E

$C_{26}H_{39}NO_7S$ [509]

ESI-MS: (positiv Ionen): 510.3 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: $R_t = 5,0$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250x4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

Fluß: 1.2 ml/min

Detektion: Diodenarray

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.38$ (2- H_a), 2.51 (2- H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14- H_a), 2.07 (14- H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.32 (23- H_3), 1.17 (24- H_3), 0.97 (25- H_3), 2.04 (27- H_3)

EPOTHILON F

$C_{27}H_{41}NO_7S$ [523]

ESI-MS: (positiv Ionen): 524.5 für $[M+H]^+$

DC: $R_f = 0,58$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: $R_t = 5.4$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250x4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40

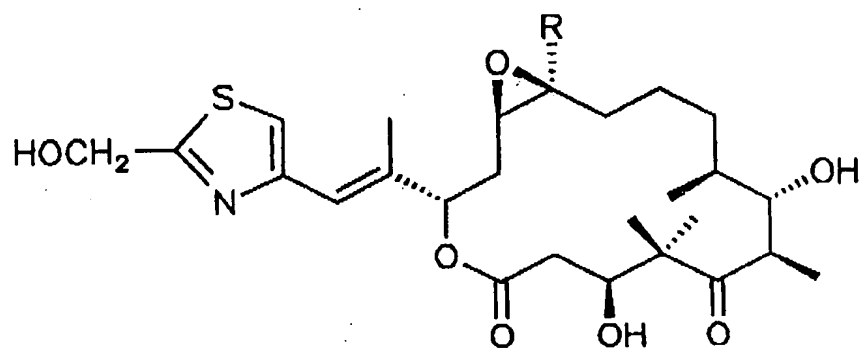
Fluß: 1,2 ml/min

Detektion: Diodenarray

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.37$ (2- H_a), 2.52 (2- H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9- H_2 , 10- H_2 , 11- H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14- H_a), 2.06 (14- H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21- H_2), 1.05 (22- H_3), 1.26 (23- H_3), 1.14 (24- H_3), 0.98 (25- H_3), 1.35 (26- H_3), 2.06 (27- H_3).

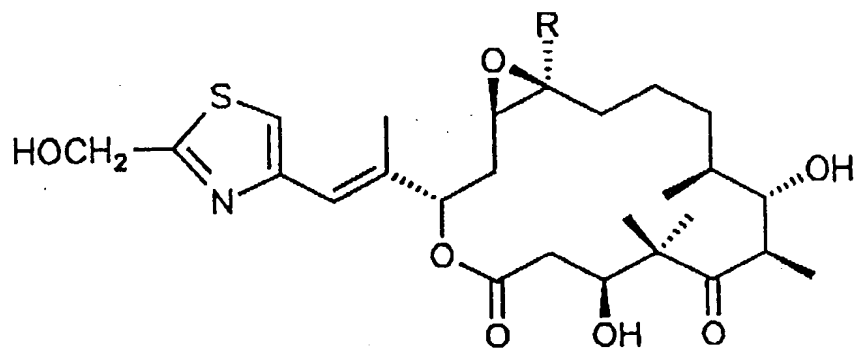
Patentansprüche

1.



Epothilon E R = H

2.



Epothilon F R = CH₃

Abb. 1 HPLC Analyse eines XAD Eluates am Ende einer Fermentation.

1/2

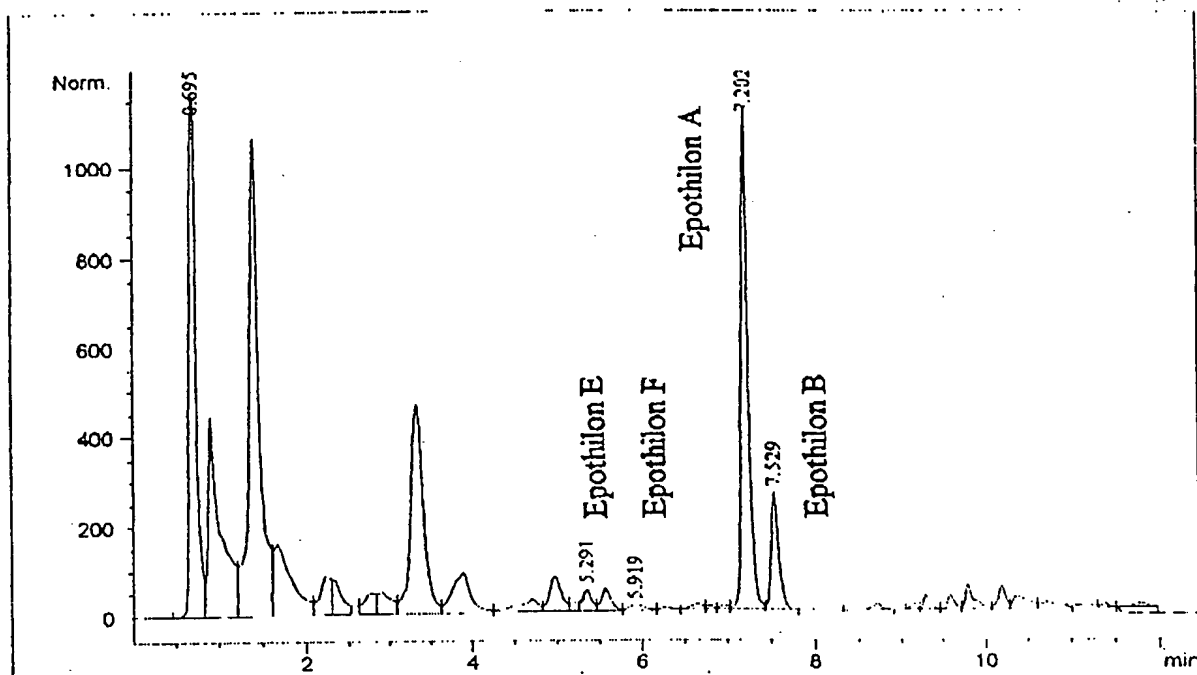


Abb. 2 Anreicherung von Epothilon E und F in einer Fermentationsbrühe nach Zufütterung eines Gemisches aus Epothilon A und B, analysiert nach 48 Stunden Inkubation.

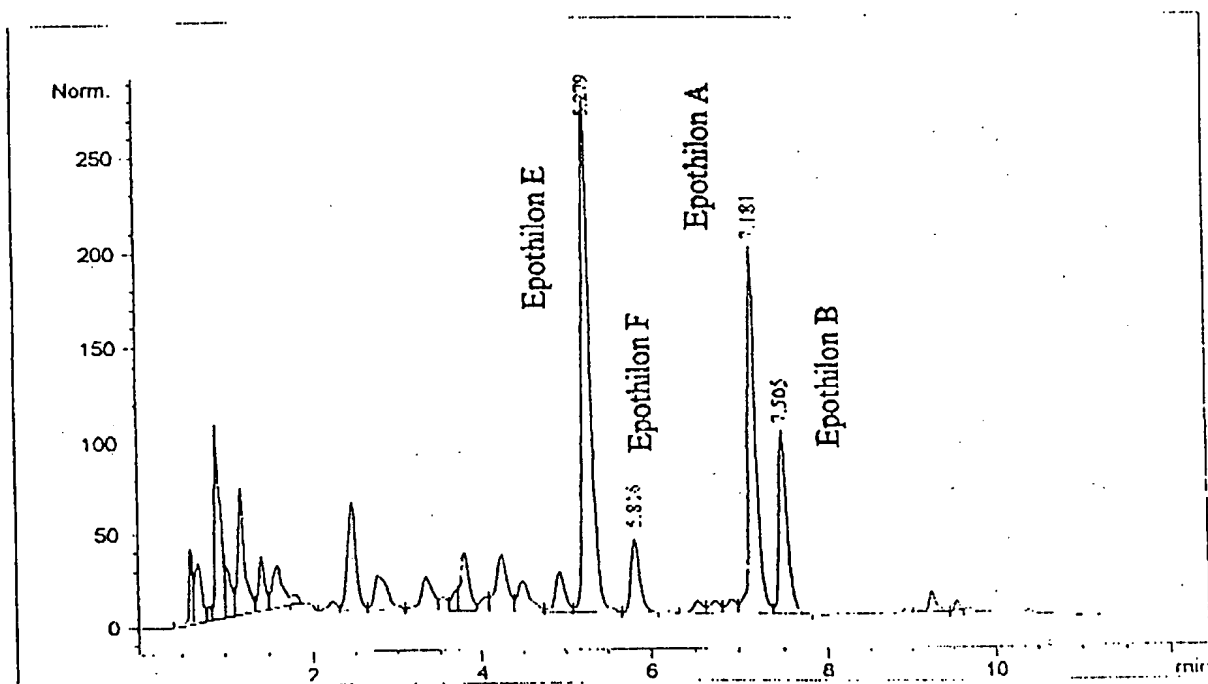


Abb. 3 Kinetik der Biotransformation von Epothilon A zu Epothilon E durch *Sorangium cellulosum* So ce90.

Biotransformation von Epothilon A

